



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) EP 1 006 192 A2

A20

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/60**, C12N 15/54,
C12N 15/77, C12P 13/02
// C12N1/21 (C12B1/15 1)

(21) Anmeldenummer: 99122650.7

(22) Anmeldetag: 13.11.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855313

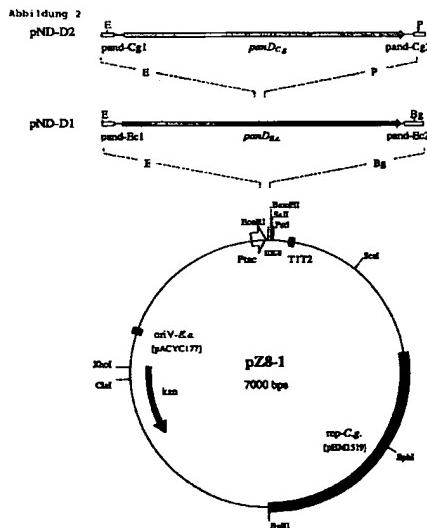
(71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:

- Dusch, Nicole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
 - Kallnowski, Jörn, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
 - Pöhler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure durch Verstärkung des panD-Gens in Mikroorganismen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation von Mikroorganismen, in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, gegebenenfalls in Kombination mit dem panB- und/oder panC-Gen, und Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder den Zellen der Mikroorganismen.



EP 1 006 192 A2

Beschreibung**Stand der Technik**

- 5 [0001] Die Pantothenäsäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.
- [0002] Pantothenäsäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Zwischenstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt und D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und man erhält D-Pantothenäsäure.
- 10 [0003] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form die frei von L-Pantothenäsäure ist.
- [0004] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothenäsäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothenäsäure-Biosynthesegenen aus *E.coli*, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothenäsäure verbessert wird.
- 15 [0005] EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von *Escherichia coli* Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069 die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin und α -Ketoisovaleriansäure tragen und in einer Nährösung, die Glucose enthält Pantoinsäure und in einer Nährösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantothenäsäure produzieren. In EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, daß nach Amplifikation der Pantothenäsäure-Biosynthesegene, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in einer Nährösung die Glucose enthält die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährösung die Glucose und β -Alanin enthält die Produktion von D-Pantothenäsäure verbessert wird.
- 20 [0006] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothenäsäure bildenden Stämmen von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantothenäsäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.
- 25

Aufgabe der Erfindung

- 30 [0007] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pantothenäsäure bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 35 [0008] Das Vitamin Pantothenäsäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran neue Verfahren zur Herstellung von Pantothenäsäure bereitzustellen.
- [0009] Wenn im Folgenden D-Pantothenäsäure oder Pantothenäsäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freien Säuren, sondern auch die Salze der D-Pantothenäsäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.
- 40 [0010] Gegenstand der Erfindung ist unter anderem ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäsäure unter Verwendung von Mikroorganismen, die insbesondere bereits D-Pantothenäsäure produzieren, und in denen das für die L-Aspartat-1-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) kodierende panD-Gen einzeln oder in Kombination mit den Genen panB und/oder panC verstärkt, insbesondere überexprimiert wird. Die Erfindung betrifft weiter entsprechende rekombinante DNA-Sequenzen, wie sie in den Ansprüchen niedergelegt sind. Gegenstand der Erfindung sind ebenso Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäsäure, die unter Verwendung der gemäß den Ansprüchen 8 bis 17 hergestellten, verbesserten, D-Pantothenäsäure erzeugenden Mikroorganismen durchgeführt werden.
- 45 [0011] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
- 50 [0012] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothenäsäure aus Glu-
- 55 cose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen.

Es kann sich um Pilze oder Hefen oder Gram-positive Bakterien z. B. der Gattung *Corynebacterium* oder um Gram-negative Bakterien wie z. B. die der Enterobacteriaceae handeln. Bei der Familie der Enterobacteriaceae ist besonders die Gattung *Escherichia* mit der Art *Escherichia coli* zu nennen. Innerhalb der Art *Escherichia coli* sind die sogenannten K-12 Stämme wie z. B. die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhard et al.: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) oder der *Escherichia coli* Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten zu nennen. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist Aminosäuren zu produzieren. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und davon abgeleitete Mutanten.

[0013] Die Erfinder fanden heraus, daß Mikroorganismen nach Überexpression des neuen für die L-Aspartat-1-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) kodierenden panD-Gens, insbesondere aus *Corynebacterium glutamicum* in verbesserter Weise Pantotheninsäure produzieren.

[0014] Die Erfinder haben darüberhinaus herausgefunden, daß die Überexpression des panD-Gens sich in Stämmen vorteilhaft auswirkt, in denen zusätzlich die für Ketopantoathydroxymethyltransferase und Pantothenatsynthetase kodierenden Gene panB und panC einzeln oder gemeinsam überexprimiert vorliegen.

[0015] Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern.

Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0016] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Darüberhinaus findet der Fachmann unter anderem Anleitungen bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134:1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13:347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40:183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America 80:21-25 (1983)).

bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26:222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80:161-169 (1989)), bei Hamilton (Journal of Bacteriology 171:4617-4622 (1989)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0017] Zur Isolierung des panD-Gens oder anderer Gene wie z.B. der Gene panB und panC von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Viera et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirts eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV9 (Vallari und Rock, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), die eine Mutation im panD-Gen trägt von

besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantothenäure-bedürftige *E. coli* Mutante ist der Stamm SJ2, der ein Mutation im panB-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der panD-Mutante DV9 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das panD-Gen trägt und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothenäure-Bedürftigkeit prototroph. Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden. Anschließend kann der Grad an Identität zu bekannten Genen, die in Datenbanken wie z.B. der GenBank (Benson et al., 1998, Nucleic Acids Research, 26:1-7) enthalten sind, mit publizierten Methoden (Alt-schul et al., 1990, Journal of Molecular Biology 215:403-410) analysiert werden.

[0018] Auf diese Weise wurde die neue für das Gen panD kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panD-Genproduktes nämlich der L-Aspartat-1-Decarboxylase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für die Gene panB und panC kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 3 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panB-Genproduktes nämlich der ketopantoathydroxymethyltransferase dargestellt und in SEQ ID NO 5 die sich ergebende Aminosäuresequenz des panC-Genproduktes nämlich der Pantothenatsynthetase dargestellt.

[0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 3 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 3 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konervative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

[0020] Das auf diese Weise charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuprägen besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionsignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Escherichia coli* kommen z.B. die Vektoren pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21), 6557-6561 (1983)) oder pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 6929 (1984)), für *Corynebacterium glutamicum* z.B. der Vektor pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) für die vorliegende Erfindung in Frage. Beispiele für derartige Mikroorganismen sind die *C. glutamicum*-Stämme ATCC13032/pND-D2 und ATCC13032/pND-DBC2 und der *E. coli*-Stamm MG1655/pND-D2, die die Plasmide pND-D2 und pND-DBC2 enthalten. Plasmid pND-D2 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender *E. coli*-*C. glutamicum* Pendelvektor der das panD-Gen von *C. glutamicum* trägt. Plasmid pND-DBC2 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender *E. coli*-*C. glutamicum* Pendelvektor der die Gene panD, panB und panC von *C. glutamicum* trägt.

[0021] Es ist dem Fachmann klar, daß chromosomal Mutationen, die Resistenz gegen Metabolite und Antimetabolite bewirken oder die das Abfließen von Vorstufen der Pantothenäure verhindern, in vorteilhafter Weise mit den Massnahmen die Gegenstand der Erfindung sind kombiniert werden können.

[0022] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothenäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0023] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenster Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren

- wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothenäure-Produktion Vorstufen der Pantothenäure wie Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüllt werden.
- [0024] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 25°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothenäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.
- [0025] Stämme, die eine hohe Aktivität des Enzyms L-Aspartat 1-Decarboxylase besitzen, können auch für die Herstellung von β -Alanin aus L-Aspartat eingesetzt werden: Hierzu können fermentative Verfahren, enzymatische Umwandlungsreaktionen oder Kombinationen beider eingesetzt werden.
- [0026] Die Konzentration an gebildeter Pantothenäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden.
- [0027] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- 30 Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-D2 als DSM12438
 Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-DBC2 als DSM12437

Beispiele

- 35 [0028] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

- 40 Klonierung und Sequenzierung des panD-Gens von C. glutamicum

1. Klonierung des panD-Gens

- [0029] Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid, 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit der Restriktionsenzym Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sau3A, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 7-9 kb wurden mit Hilfe des "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland; Cat. No. 740584) isoliert und in die dephosphorylierte BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 (Norlander et al., 1982, Gene, 26:101-106), der von der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen wurde, ligiert. Die Ligation wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C konnte die C. glutamicum Genbank durch Reisolierung der Plasmid-DNA nach der "Alkalischen-Lyse-Methode" von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523, 1997) aus den Transformanten gewonnen werden. Mit dieser Genbank wurden kompetente Zellen des E. coli Stamms DV9 (Vallari und Rock, 1985, Journal of Bacteriology, 164:136-142), welcher eine Mutation im panD-Gen trägt, elektroporiert. Der Elektroporationsansatz wurde im Anschluß

an die Regenerationsphase (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) zweimal mit Medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) gewaschen. Die Zusammensetzung des Mediums E ist in Tabelle 1 dargestellt. Mit diesen Zellen wurden 50 ml Medium E + 100 µg/ml Ampicillin, die in einem 250 ml Erlenmeyerkolben vorlagen, inoculiert und in einem Luftschüttler bei 250 U/min und 39°C inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Bakteriensuspension verdünnt und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) ausgestrichen, der mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert worden war.

Tabelle 1

Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
K ₂ HPO ₄	10 g	
NaNH ₄ HPO ₄ *4 H ₂ O	3,5 g	
Zitronensäure	2 g	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g	
Glukose	4 g	separat sterilisieren
Thiamin	0,2 µg	sterilfiltrieren

20

[0030] Die Plasmid-DNA einer DV9-Transformante wurde isoliert, als pNIC-1.3 bezeichnet und mittels Agarosegel-elektrophorese (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour-Laboratory Press) und Vergleich mit Standard-DNA-Fragmenten bekannter Länge charakterisiert. Plasmid pNIC-1.3 enthält eine Insertion von 7 kbp Länge. Die Komplementationsfähigkeit von pNIC-1.3 wurde durch erneute Transformation der panD Mutante DV9 überprüft. Die erhaltenen Transtormanten waren wiederum fähig, in β-Alanin-freiem Medium E unter den oben angegebenen Bedingungen zu wachsen.

[0031] Die Subklonierung des 7 kb Inserts erfolgte durch Spaltung des Plasmids pNIC-1.3 mit den Restriktionszymen BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-03), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRI, Code no. 27-0884-03) und BglII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BglII, Code no. 27-0946-02) und anschließender Ligation in den entsprechend restriktionsverdauten Vektor pK18mob (Schäfer, 1994, Gene, 145:69-73). Der erwähnte Ligationsansatz wurde in die *E. coli* panD Mutante DV9 elektroporiert; die Selektion auf komplementierte Transformanten erfolgte wie oben beschrieben wobei die Agarplatten in diesem Fall 50 µg/ml Kanamycin enthielten. Die Plasmide von komplementierten Einzelkionen wurden isoliert und mittels Restriktionsanalysen charakterisiert. Ein EcoRI-Subklon, im Folgenden pNIC-10 genannt, mit einem ungefähr 3 kb großen DNA-Insert wurde für die folgende Sequenzanalyse ausgewählt.

2. Sequenzierung des panD-Gens

[0032] Für die doppelsträngige Sequenzierung des 3 kb Fragments von pNIC-10 wurde dieses mit verschiedenen Restriktionszymen gespalten und die Fragmente in die Plasmide pUC19 oder pK18mob subkloniert. Die zum Sequenzieren eingesetzte Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem "QIAGEN Plasmid Mini kit" (Qiagen, Inc., Chatsworth, Ca., USA) isoliert und die Bestimmung der Plasmidgrößen mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

[0033] Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 74:5453-5467, 1977) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (Nucleic Acids Research, 18:1067, 1990). Es wurde der "Cy5-AutoRead Sequencing kit" von Pharmacia (Product No. 27-2690-02, Freiburg, Germany) angewandt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzeraktion erfolgte in einem "Long Ranger Gel Solution"-Polyacrylamidgel (FMC BioProducts, Rockland, Me., USA) mit dem "automatischen Laser-Fluoreszenz (A.L.F.) Express DNA Sequenzergerät" von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (Nucleic Acids Research, 14:217-231, 1986) Version 97-0 prozessiert. Sämtliche Einzelsequenzen der pNIC-10 Subklone wurden zu einem zusammenhängenden 3060 bp langen Contig assembliert, der als Contig13 bezeichnet wurde. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) des gesamten DNA-Fragments ergab die Identifizierung von fünf offenen Leseraster (ORFs). In Abbildung 1 ist ein Restriktionskarte von Contig13 sowie die Lage der als orf- bis orf-5 bezeichneten ORFs dargestellt. Homologieanalysen wurden mit den "BLAST search programs" (Gish and States, 1993, Nature of Genetics,

3:266-272; Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology, 215:403-410), welche über den Online-Service des NCBI-Servers der "National Library of Medicine" (Bethesda, MD, USA) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Die Analyse von Contig13 ergab, daß orf-3 das panD-Gen ist. Im Folgenden wird orf-3 als panD bezeichnet. Die Nukleotidsequenz des das panD-Gen tragenden DNA-Fragmentes ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Aminosäuresequenz des sich mit obigen Methoden ergebenden panD-Genproduktes nämlich der L-Aspartat 1-Decarboxylase ist als SEQ ID NO 2 wiedergegeben.

5

Beispiel 2

10 Klonierung und Sequenzierung der Gene panB und panC aus *C. glutamicum*

1. Klonierung der Gene panB und panC

[0034] Chromosomal DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auf trennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende 20 Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10 µg/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb, enthielten isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank 25 mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der *E. coli* Mutante SJ2 heterolog zu 30 komplementieren, bestätigt werden.

[0035] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb (Abbildung 2). Die Transformation der *E. coli* panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in 35 der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

35

2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0036] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 2) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subkline erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal und reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden. Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzieransätze erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequenzierteil (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Paket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 3 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist als SEQ ID NO 4 wiedergegeben. Das zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

50 Beispiel 3

Konstruktion von Vektoren zur Expression von panD, panBC und panDBC

[0037] Die Pantothenatbiosynthese-Gene aus *C. glutamicum* und *E. coli* wurden unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonucleotiden amplifiziert. Die PCR-Experimente wurden mit der Tag DNA polymerase der Firma Gibco-BRL (Eggstein, Deutschland) in einem "PCT-100 Thermocycler" (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) durchgeführt. Auf einen einmaligen Denaturierungsschritt von 2 Minuten bei 94°C folgte ein Denaturierungsschritt von 90 Sekunden bei 94°C, ein Annealingschritt für 90 Sekunden bei einer Primerabhängi-

EP 1 006 192 A2

- gen Temperatur von $T=(2AT+4GC)$ - 5 °C (Suggs, et al., 1981, S. 683-693, In: D. D. Brown, and C. F. Fox (Eds.), Developmental biology using purified genes. Academic Press, New York, USA) sowie ein 90 Sekunden dauernder Extensionsschritt bei 72°C. Die letzten drei Schritte wurden 35 mal zyklisch wiederholt und die Reaktion wurde mit einem finalen Extensionsschritt von 10 Minuten bei 72°C beendet. Die so amplifizierten Produkte wurden, nachdem sie im Agarosegel elektrophoretisch geprüft worden sind, den Herstellerangaben zufolge in den Vektor pCR® 2.1 (Original TA Cloning Kit, Invitrogen (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01.) ligiert und anschließend in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion auf Transformanten erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 24 Stunden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid).
- [0038] Ausgehend von den Nucleotidsequenzen der Pantothenatbiosynthese-Gene panD (SEQ ID NO 1) und panBC (SEQ ID NO 3) von C. glutamicum ATCC 13032 und von E. coli K12 (W.K. Merkel and B.P. Nichols, 1993, GenBank: L17086) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Diese Primer wurden so ausgewählt, daß die amplifizierten Fragmente die Gene sowie deren native Ribosomen-Bindestellen, nicht aber mögliche Promotor-Regionen enthalten. Zusätzlich wurden geeignete Restriktionsschnittstellen eingefügt, die das Klonieren in den Zielvektor ermöglichen. Die Sequenzen der PCR-Primer, die eingefügten Schnittstellen (Sequenz unterstrichen) sowie das amplifizierte Gen (Fragmentgröße in bp ist in Klammern angegeben) sind in der folgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2

Primer	Sequenz mit Restriktionsschnittstelle	Produkt	Plasmid
panD-Ec1	5' - <u>GAATT</u> CGACAGGGTAGAAAGGTAGA-3' EcoRI	panD _{E.c.} (462 bp)	pND-D1
panD-Ec2	5' - <u>AGATCT</u> GGATAACAATCAAGCAACC-3' BglII		
panD-Cg1	5' -CATCTCACGCT <u>ATGAATTCT</u> -3' EcoRI	panD _{C.g.} (405 bp)	pND-D2
panD-Cg2	5' - <u>ACGAGGCCTGCAGCAATA</u> -3' PstI		
panBC-E1	5' - <u>GGATCCCACAAACATCAATTATCAGG</u> -3' BamHI	panBC _{E.c.} (1700 bp)	pND-BC1
panBC-E2	5' - <u>GGATCCTTAAGTATTACGCCAGCTC</u> -3' BamHI		
panBC-C1	5' - <u>GTCGACTCTGAGCTGGTCATCACATC</u> -3' SalI	panBC _{C.g.} (1700 bp)	pND-BC2
panBC-C2	5' - <u>GTCGACACGCAGGGTTGGTACTAGAG</u> -3' SalI		

- [0039] Als Basisvektor zur Expression sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde der in Abbildung 3 dargestellte *E. coli*-*C. glutamicum*-Shuttle-Expressionsvektor pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) eingesetzt. Die zuvor in den Vektor pCR®2.1 klonierten Amplifikate wurden mittels der Primer-inserierten Restriktionsschnittstellen in den ebenso behandelten Expressionsvektor pZ8-1 ligiert und somit unter die Kontrolle des auf diesem Plasmid enthaltenen tac-Promotors gebracht. Einzige Ausnahme stellt das Amplifikat panD_{E.c.} dar, hier wurde das EcoRI-BgII-Fragment in die kompatiblen EcoRI-BamHI-Restriktionsenden des Vektors pZ8-1 kloniert. Die jeweiligen Plasmidbezeichnungen für die so konstruierten Expressionsplasmide sind in der Tabelle 2 angegeben. Der Expressionsvektor pZ8-1 mit dem Gen panD_{E.c.} von *E. coli* wird pND-D1 und pZ8-1 mit dem Gen panD_{C.g.} von *C. glutamicum* wird pND-D2 genannt. Entsprechend werden die Expressionsplasmide, die PanBC_{E.c.} und panBC_{C.g.} enthalten als pHD-BC1 bzw. pND-BC2 bezeichnet. Beispielhaft ist in der Abbildung 3 die Klonierungsstrategie für die Gene panD_{E.c.} und panD_{C.g.} in den Vektor pZ8-1 dargestellt. Die korrekte Klonierung aller Expressionsplasmide wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Inserts überprüft.
- [0040] Weiterhin wurden sowohl mit den *E. coli* als auch mit den *C. glutamicum* panD-Genen ein künstliches panDBC-Operon konstruiert. Für das *E. coli* Operon wurde der panD_{E.c.} enthaltende Vektor pCR2.1 mit EcoRI gespalten, die DNA im Agarosegel aufgetrennt und das panD-Fragment wurde, wie schon in Beispiel 1.1 beschrieben, mittels "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) aus dem Gel aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in das EcoRI gespaltene Plasmid pND-BC1 ligiert. Plasmide mit einer korrekten Orientierung des panD-Gens wurden dadurch erhalten, daß das Ligationsgemisch in den panD auxotrophen *E. coli* Stamm DV9 transformiert und dieser wie in Beispiel 1 beschrieben auf Komplementation der Auxotrophie hin selektioniert wurde. Plasmid-DNA der komplementierten Mutanten wurde isoliert und die korrekte Genanordnung wurde durch Ansequenzierung des Inserts des pND-DBC1 genannten Plasmids bestätigt (Abbildung 4).
- [0041] Für die Konstruktion des *C. glutamicum* panDBC-Operons wurde ähnlich verfahren. Der panD_{C.g.} enthaltene Vektor pCR2.1 wurde EcoRI gespalten, wodurch das panD_{C.g.}-Gen zum einen über die Primer-interne und zum anderen über eine EcoRISchnittstelle des Vektors aus diesem herausgespalten wurde. Dieses Gen-Fragment wurde nach Aufreinigung in den EcoRIGespaltenen Vektor pZ8-1 kloniert und Plasmide mit der korrekten panD-Orientierung, pND-D4 genannt, wurden wie oben beschrieben erhalten und überprüft. Anschließend wurde das Plasmid pND-D4 mit dem Restriktionsenzym Sall gespalten und mit dem aufgeregneten panBC-Fragment, welches durch Sall-Verdau (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sall Code no. 27-0882-01) des Plasmids pND-BC2 erhalten wurde, ligiert. Das Elektroporationsgemisch wurde in den *E. coli* Stamm DH5αMCR elektroporiert und die 10 Plasmide mit der Genanordnung panDBC wurden durch Restriktionsanalysen ermittelt. Die korrekte Genanordnung eines dieser Plasmide, das als pND-DBC2 (Abbildung 4) bezeichnet wurde, wurde durch Sequenzanalyse verifiziert.
- [0042] Der Expressionsvektor pZ8-1 sowie die auf diesem Plasmid beruhenden Konstrukte pND-D1, pND-D2 und pND-DBC1 wurden in den *E. coli* Stamm MG1655 transformiert und Transformanten auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 50 µg/ml Kanamycin selektiert. Die erhaltenen Stämme wurden MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 und MG1655/pND-DBC1 genannt.
- [0043] Durch Elektroporation der Plasmide pZ8-1, pND-D1, pND-D2 und pND-DBC2 in den *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 und anschließender Selektion auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 25 µg/ml Kanamycin wurden die Stämme ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 und ATCC13032/pND-DBC2 erhalten.

Beispiel 4

- Bildung von Pantothenat durch verschiedene *E. coli* K12 Stämme
- [0044] Die quantitative Bestimmung von D-Pantothenat erfolgte mittels des *Lactobacillus plantarum* Pantothenat-Assays (Teststamm: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, Cat. No.3211-30-3; Kulturmedium: Bacto Pantothenate Assay Medium (DIFCO Laboratories, Michigan, USA), Cat. No. 0604-15-3) Dieser Indikatorstamm kann nur bei Anwesenheit von Pantothenat im angegebenen Kulturmedium wachsen und zeigt eine photometrisch meßbare, lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenat-Konzentration des Mediums. Für die Kalibrierung wurde das Hemicalculumsalz von Pantothenat eingesetzt (Sigma, Produktbezeichnung P 2250). Die optische Dichte wurde an einem LKB Biochrom Photometer der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 580 nm (o.D.₅₈₀) bestimmt.
- [0045] Für die Pantothenat-Produktion der *E. coli* Stämme MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 und MG1655/pND-DBC1 wurden 50 ml Testmedium (Medium E mit 50 µg/ml Kanamycin) aus einer 16 Stunden alten Kultur des gleichen Mediums mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 5 und 72stündiger Inkubation dieser Kulturen bei 37°C und 250 (U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g pelletiert. Der erhaltene zellfreie Überstand wurde sterilfiltriert und bis zur Pantothenat-Quantifizierung bei 4°C gelagert.
- [0046] Die Quantifizierung des D-Pantothenats im Kulturüberstand erfolgte mittels *L. plantarum* ATCC 8014 nach

EP 1 006 192 A2

Angaben des Handbuchs der Firma DIFCO (DIFCO MANUAL, 10th Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

5 10 15	Stamm	Gen	oD ₅₈₀ und Pantothenat-Akkumulation ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
			5 Std.		72 Std.	
			oD ₅₈₀	Pan.	oD ₅₈₀	Pan.
	MG1655/pZ8-1	-	2,0	0,30	2,3	1,47
	MG1655/pND-D1	panD _{E.c.}	2,3	0,90	2,5	6,95
	MG1655/pND-DBC1	PanDBC _{E.c.}	2,0	0,96	2,0	6,96
	MG1655/pND-D2	panD _{C.g.}	2,2	4,07	2,3	9,66

Beispiel 5

Bildung von Pantothenat durch verschiedene Stämme von C. glutamicum

[0047] Die Bildung von Pantothenat durch die C. glutamicum Stämme ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 und C. glutamicum ATCC13032/pND-DBC2 wurden in Medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603; Tabelle 4), das mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin supplementiert wurde, geprüft. Dieses Medium wird im Folgenden als C. glutamicum-Testmedium bezeichnet. Je 50 ml C. glutamicum-Testmedium wurden aus einer 16 Stunden alten Kultur des gleichen Mediums mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 48stündiger Inkubation bei 30°C und 150 U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g entfernt, der Überstand sterilfiltriert und die Pantothenat-Konzentration wie in Beispiel 4 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse der Pantothenat-Produktion durch die verschiedenen Stämme von C. glutamicum sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4

35	Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	
	Harnstoff	5 g	
	KH ₂ PO ₄	1 g	
40	K ₂ HPO ₄ 1 g		
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O 0.25 g		
	MOPS	42 g	
	CaCl ₂	10 mg	
45	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg	
	MnSO ₄ * H ₂ O	10 mg	
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mg	
50	CuSO ₄	0.2 mg	
	NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.02 mg	
	Biotin	0.5 mg	
55	Glukose	40 g	separat autoklavieren
	Protocatechusäure	0.03 mg	sterilfiltrieren

Tabelle 5

	Stamm	Gen	Pantothenat ($\mu\text{g/ml}$)	
			oD_{580}	Pan.
	ATCC13032/pZ8-1	-	21	0,19
10	ATCC13032/pND-D1	PanD _{E.c.}	20	0,32
	ATCC13032/pND-D2	panD _{C.g.}	19	1,78
	ATCC13032/pND-DBC2	panDBC _{C.g.}	20	2,60

15 Abbildungen

[0048] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

- Abbildung 1: Karte des Contig13 mit orf-1-orf-5
- 20 • Abbildung 2: Karte des in pUR1 enthaltenen, klonierten DNA-Fragmentes und Lageangabe des sequenzierten DNA-Abschnittes
- Abbildung 3: Karte der Plasmide pZ8-1, pND-D1 und pND-D2
- Abbildung 4: Karte der Plasmide pND-DBC1 und pND-DBC2

25 [0049] Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

- rrnBT1T2: Transkriptions-Terminator des rrnB-Gens
- P_{tac}: tac Promotor
- 30 panB: Kodierbereich des panB Gens
- panC: Kodierbereich des panC Gens
- 35 panD: Kodierbereich des panD Gens
- rep-C.g.: DNA-Region für Replikation in *C. glutamicum*
- oriV-E.c.: Ursprung für vegetativen Transfer in *E. coli*
- 40 kan: Resistenzgen für Kanamycin
- EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
- 45 E: Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
- BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms BamHI
- B
- 50 BgIII: Schnittstelle des Restriktionsenzyms BgIII
- Clal: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Clal
- 55 H: Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII
- Ncol: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Ncol

EP 1 006 192 A2

Nrul: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Nrul
Nsil: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Nsil
5 P: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI
PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI
Pvul: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Pvul
10 SacI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms SacI
Sall: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Sall
15 Scal: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Scal
SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms SphI
X: Schnittstelle des Restriktionsenzyms XbaI
20 Xhol: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Xhol

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
(B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
(C) ORT: Frankfurt am Main
(D) BUNDESLAND: Hessen
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: D-60311

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur
fermentativen Herstellung von D-Pantothensaeure
durch Verstaerzung des panD-Gens in
Mikroorganismen

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 540 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

40

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
(B) STAMM: ATCC13032

45

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
(B) LAGE: 77..484
(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 77

50

55

/EC_number= 4.1.1.11
 /product= "L-Aspartat-1-decarboxylase"
 /gene= "panD"

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AATATTCCCTT	TCCTTGTCAT	CTCACGCTAT	GATTTCTAAA	ACTTGCAGGA	CAACCCCCAT	60
10	AAGGACACCA	CAGGAC	ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC			109
			Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His			
			1	5	10	
15	CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC					157
	Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp	Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr				
	15	20	25			
20	ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GCC GGA TTG ATC GAA GGC GAA AAA					205
	Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys					
	30	35	40			
25	GTT GCC ATC GTC GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC					253
	Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val					
	45	50	55			
30	ATT GTG GGC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT					301
	Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala					
	60	65	70	75		
35	GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT					349
	Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu					
	80	85	90			
40	CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC					397
	Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His					
	95	100	105			
45	GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA					445
	Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu					
	110	115	120			
50	GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTA					494
	Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile					
	125	130	135			
	GCTCGCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC					540

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

40

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LAENGE: 136 Aminosaeuren
 - (B) ART: Aminosaeure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

45

- (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His Arg Ala Thr Val Thr					
1	5	10	15		
50	Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr Ile Asp Ala Asp Leu				
	20	25	30		
	Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys Val Ala Ile Val Asp				
	35	40	45		

55

Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val Ile Val Gly Asp Ala
 50 55 60

Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala Ala His Leu Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu Gln Ala Thr Asp Ala
 85 90 95

Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His Val Asp Ala Asp Asn
 10 100 105 110

Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu Ala Leu Pro Gly Ser
 115 120 125

Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile
 130 135

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LAENGE: 2164 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25 (iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Corynebacterium glutamicum*
- (B) STAMM: ATCC13032

30 (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
- (B) LAGE: 351..1163
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 351
 /EC_number= 4.1.2.12
 /product= "Ketopantoathydroxymethyltransferase"
 /gene= "panB"

35 (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
- (B) LAGE: 1166..2002
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 1166
 /EC_number= 6.3.2.1
 /product= "Pantothenatsynthetase"
 /gene= "panC"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCTTCGGGGT ACCAATTCTT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA 60

45 GATTTCAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA 120

AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATCG AATTAGTTCA 180

CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TCGGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG 240

50 TCTTGAGGTA AAAATTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT 300

GAATCAAATC GGAATTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC 356
 Met Pro

EP 1 006 192 A2

	ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu 140 145 150	404
5	GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala 155 160 165 170	452
10	CTT TCG CGC CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val 175 180 185	500
	GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser 190 195 200	548
15	ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala 205 210 215	596
20	ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu 220 225 230	644
	GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu 235 240 245 250	692
25	ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG Thr Gly Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile Ala Gln 255 260 265	740
30	ACG ATT CGA CGC ATT GTT GAT GCT GGA ATT CCG GTT GTC GGC CAC ATC Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly His Ile 270 275 280	788
	GGG TAC ACC CCG CAG TCC GAG CAT TCC TTG GGC GGC CAC GTG GTT CAG Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val Val Gln 285 290 295	836
35	GGT CGT GGC GCG AGT TCT GGA AAG CTC ATC GCC GAT GCC CGC GCG TTG Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg Ala Leu 300 305 310	884
40	GAG CAG GCG GGT GCG TTT GCG GTT GTG TTG GAG ATG GTT CCA GCA GAG Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro Ala Glu 315 320 325 330	932
	GCA GCG CGC GAG GTT ACC GAG GAT CTT TCC ATC ACC ACT ATC GGA ATC Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile Gly Ile 335 340 345	980
45	GGT GCC GGC AAT GGC ACA GAT GGG CAG GTT TTG GTG TGG CAG GAT GCC Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln Asp Ala 350 355 360	1028
	TTC GGC CTC AAC CGC GGC AAG AAG CCA CGC TTC GTC CGC GAG TAC GCC Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu Tyr Ala 365 370 375	1076
50	ACC TTG GGC GAT TCC TTG CAC GAC GCC GCG CAG GCC TAC ATC GCC GAT Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile Ala Asp 380 385 390	1124

EP 1006 192 A2

	ATC CAC GCG GGT ACC TTC CCA GGC GAA GCG GAG TCC TTT TA ATG CAG Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Ala Glu Ser Phe Met Gln 395 400 405 1	1171
5	GTA GCA ACC ACA AAG CAG GCG CTT ATC GAC GCC CTC CTC CAC CAC AAA Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His His Lys 5 10 15	1219
10	TCC GTC GGG CTC GTC CCC ACC ATG GGT GCG CTA CAC AGC GGA CAC GCC Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly His Ala 20 25 30	1267
15	TCG TTG GTT AAA GCA GCA CGC GCT GAA AAC GAC ACT GTT GTA GCC AGT Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val Ala Ser 35 40 45 50	1315
20	ATT TTT GTC AAT CCC CTG CAG TTT GAA GCA CTC GGT GAT TGC GAT GAT Ile Phe Val Asn Pro Leu Glu Ala Leu Gly Asp Cys Asp Asp 55 60 65	1363
25	TAC CGC AAC TAT CCC CGC CAA CTC GAC GCC GAT TTA GCA CTG CTT GAA Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu Leu Glu 70 75 80	1411
30	GAG GCA GGT GTG GAT ATT GTG TTC GCA CCC GAT GTG GAG GAA ATG TAC Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu Met Tyr 85 90 95	1459
35	CCC GGT GGC TTG CCA CTA GTG TGG GCG CGC ACC GGT TCC ATC GGA ACA Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile Gly Thr 100 105 110	1507
40	AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr 115 120 125 130	1555
45	GTG GTG GCG AAG CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe 135 140 145	1603
50	GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala 150 155 160	1651
55	GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly 165 170 175	1699
60	GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT GCG GAT Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp 180 185 190	1747
65	CAG CGA CGG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln 195 200 205 210	1795
70	CGT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp 215 220 225	1843
75	ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val 230 235 240	1891
80	GAT CCA GCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln 245 250 255	1939

EP 1 006 192 A2

CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile 260 265 270	1987
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

5 GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC ACCACGCAGC TTTCGATAAC Asp Asn Ile Glu Leu 275	2042
-------------------------------------------------------------------------------------------------	------

GCGTGCTCAG CTCAGTGTGTT TTAGGTGGCGC GGTGGGATC GGAACCGGGA GTTGGCCACT 10 GCGGTGGCGT GCCCTCACCC GACAGGCCCC ATGCCGCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA	2102
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

CA	2162
----	------

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren (B) ART: Aminosaeure (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe 1 5 10 15

25 Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr 20 25 30

25 Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu 35 40 45

30 Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr 50 55 60

35 Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr 65 70 75 80

40 Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr 85 90 95

45 Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met 100 105 110

50 Arg Glu Thr Gly Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Val Glu Ile 115 120 125

55 Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly 130 135 140

60 His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val 145 150 155 160

65 Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg 165 170 175

70 Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro 180 185 190

75 Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile 195 200 205

80 Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln 210 215 220

Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu
 225 230 235 240

5 Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile
 245 250 255

Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe
 260 265 270

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 279 Aminosaeuren
- (B) ART: Aminosaeure
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

20 His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly
 20 25 30

His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val
 35 40 45

25 Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys
 50 55 60

Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu
 65 70 75 80

30 Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu
 85 90 95

Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile
 100 105 110

35 Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val
 115 120 125

Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala
 130 135 140

40 Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu
 145 150 155 160

Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile
 165 170 175

45 Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser
 180 185 190

Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly
 195 200 205

50 Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala
 210 215 220

Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu
 245 250 255
 5 Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg
 260 265 270
 Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu
 275

10

Patentansprüche

- 15 1. In Mikroorganismen der Gattungen *Corynebacterium* und *Escherichia* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA, die eine für Aspartat-1-decarboxylase codierende Nucleotidsequenz enthält.
2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1, deren Nucleotidsequenz für panD mit der Herkunft aus einem *Corynebacterium* codiert, deren Lage in Abb. 1 wiedergegeben wird.
- 20 3. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, mit:
 - 25 (i) der Nucleotidsequenz, gezeigt in SEQ.-ID.-Nr. 1, die für panD codiert, oder
 - (ii) einer Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht; oder
 - 30 (iii) einer Sequenz, die mit einer zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).
- 35 4. Mikroorganismen, insbesondere der Gattungen *Corynebacterium* oder *Escherichia*, transformiert durch die Einführung der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Plasmidvektor pND-D2, gekennzeichnet durch die in der Abbildung 2 wiedergebene Restriktionskarte, hinterlegt als *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-D2 unter der Bezeichnung DSM 12438.
- 40 6. Plasmidvektor pND-DBC2, gekennzeichnet durch die in der Abbildung 4 wiedergebene Restriktionskarte hinterlegt als *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-DBC2 unter der Bezeichnung DSM 12437.
- 45 7. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure, indem man das panD-Gen und gegebenenfalls weitere für die Aspartat-1-decarboxylase codierende Nucleotidsequenzen in Mikroorganismen verstärkt (überexprimiert) und diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
- 50 8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen durch Transformation von Mikroorganismen mit diese Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren oder durch chromosomal Amplifikation erhöht.
- 55 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erzielung der Überexpression die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und

Regulationsregion mutiert.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.
11. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Expression des panD-Gens in den Mikroorganismen durch Verlängerung der Lebensdauer der entsprechenden m-RNA und/oder Verhinderung des Abbaus des zugehörigen Enzymproteins verbessert.
12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das panD-Gen in Mikroorganismen überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.
13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Mikroorganismen zu Erzielung der Überexpression in geänderten Kulturmedien fermentiert und/oder die Fermentationsführung ändert.
14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Pantothenat-(Pantothensäure)-bildung verringern.
15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zum panD-Gen die übrigen Gene des Stoffwechselweges der Pantothensäurebildung, einzeln oder gemeinsam verstärkt (überexprimiert).
16. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man eines oder mehrere der Gene, die für die Enzyme Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), und Pantothenat-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren, zusätzlich zum panD-Gen, insbesondere mit der Herkunft Corynebacterium verstärkt (überexprimiert)
17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 15 und 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß man mit verschiedenen kompatiblen, die genannten Gene einzeln enthaltenden Plasmidvektoren transformierte Mikroorganismen einsetzt.
18. Verfahren gemäß den Ansprüchen 15 und 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt und der Plasmidvektor eines oder mehrere der genannten Gene einschließlich des panD-Gens trägt, in dem die Gene nacheinander angeordnet und unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promoters oder getrennt voneinander angeordnet unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gestellt werden.
19. Verfahren gemäß Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man mit dem Plasmidvektor pND-D2 transformierte Mikroorganismen einsetzt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man mit dem Plasmidvektor pND-DBC2 transformierte Mikroorganismen einsetzt.
21. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure,

**dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:**

- 5 a) Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
 in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, gegebenenfalls in Kombination mit dem
 panB-und/oder panC-Gen,
 b) Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
 c) Isolieren der Pantothensäure.

10 **22. Verfahren gemäß Anspruch 21,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die überexprimierten Gene aus Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium stammen.**

15 **23. Verfahren gemäß den Ansprüchen 21 oder 22,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man in Stufe a) eine Vorstufe der Pantothensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe Aspartat, β-Alanin,
 Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.**

20 **24. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man Mikroorganismen der Gattungen Escherichia oder Corynebacterium einsetzt.**

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

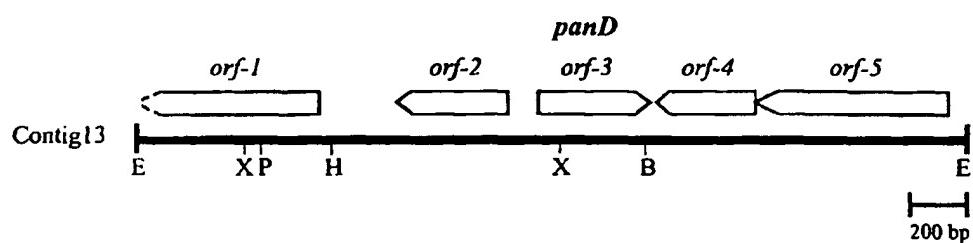


Abbildung 2

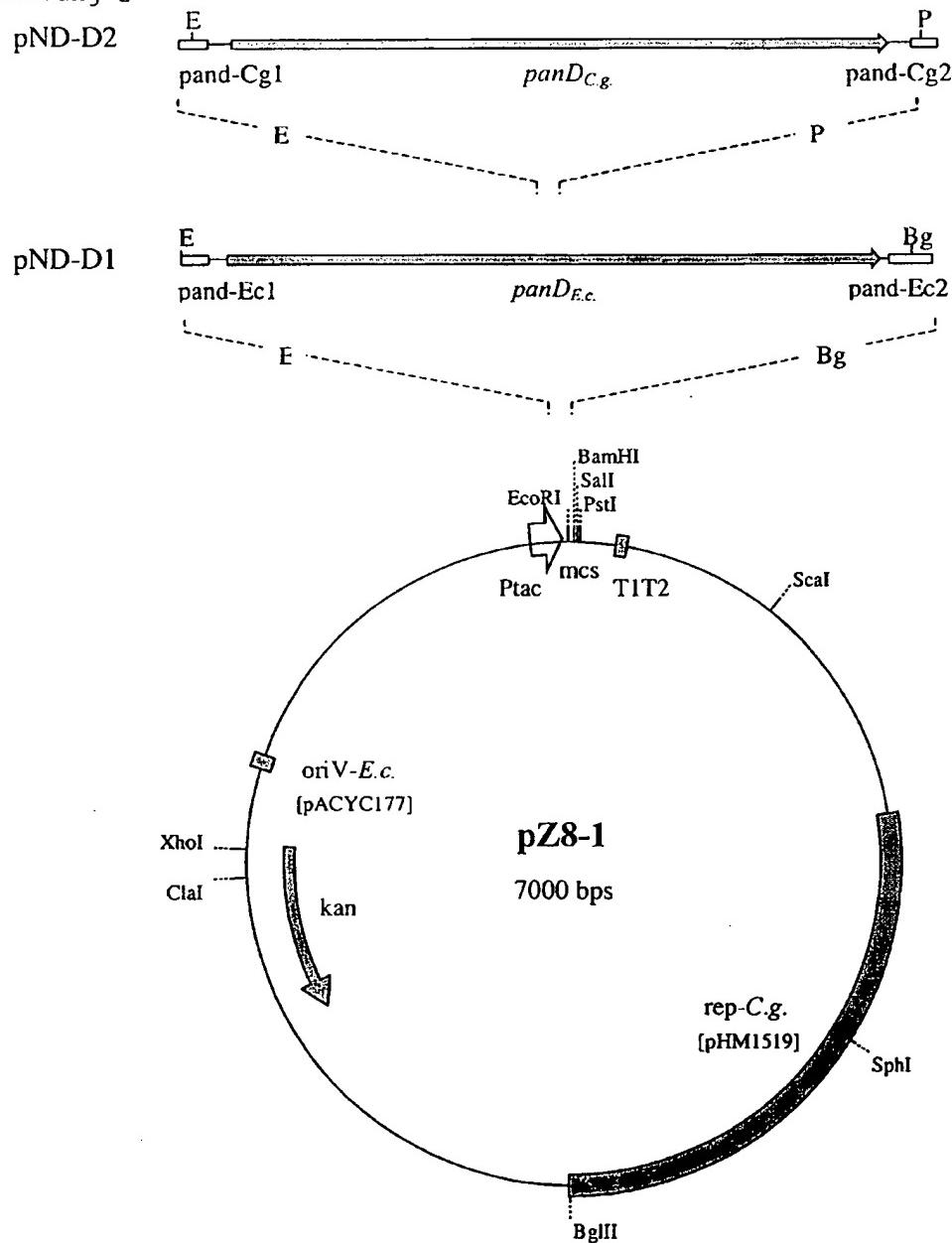


Abbildung 3

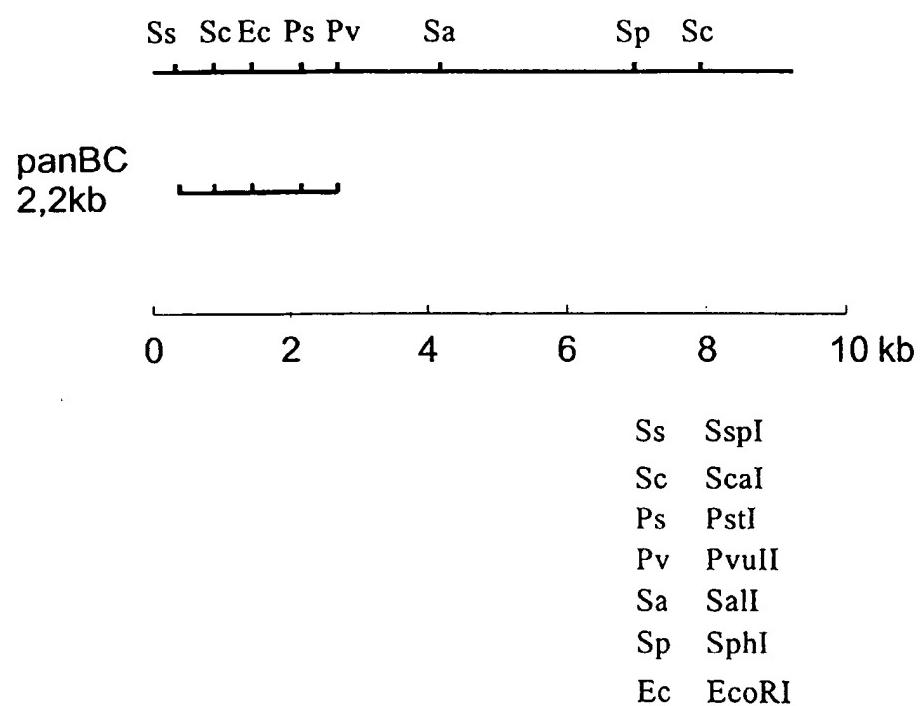


Abbildung 4:

